

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

17. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月17日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-116348
[ST. 10/C]: [JP2003-116348]

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

PCT

出 願 人
Applicant(s): 早出 広司

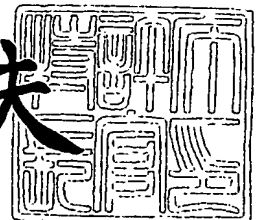
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 TUAT0301
【特記事項】
【提出日】 平成15年 3月17日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
【住所又は居所】 東京都目黒区南 1 - 1 3 - 1 6
【氏名】 早出 広司
【特許出願人】
【識別番号】 596153357
【氏名又は名称】 早出 広司
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フルクトシルアミン酸化酵素

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の (a) または (b) のフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) アミノ酸配列 (a) において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質。

【請求項2】 以下の (a) または (b) の蛋白質であるフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) アミノ酸配列 (a) において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質

【請求項3】 以下の (c) または (d) の配列であり、フルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記 (c) の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項4】 配列 GlyPhePhePheGluAlaAspGluAsnAsnGLuIleLysを含むフルクトシルアミン酸化酵素。

【請求項5】 以下の e) ~ h) の「いずれかの配列を有することを特徴とするフルクトシルアミン酸化酵素。

e) PheHisTyrAspTyrValAlaProLeuAlaLysProAsnSerLysGluArg

f) AspAlaProLeuLeuHisAspLysGluTyrTyrGluGLuLeuGlnLys-

-A s n G l y L e u A r g A s n T y r A r g T y r I l e S e r T h r
g) T h r L y s G l y A s p L y s G l y L e u A s p P r o G l u A s p
L y s

h) T r p V a l S e r V a l G l u A s n P r o T h r P r o H i s L y s
L e u G l u

【請求項6】請求項1～5において*P i c h i a* sp. N1-1株または*P i c h i a*属由来であるフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子。

【請求項7】請求項1～6のいずれかに記載のフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子を含有する組み換えベクター。

【請求項8】請求項7に記載の組み換えベクターで形質転換した形質転換体または形質導入体。

【請求項9】請求項8記載の形質転換体を培養して、該培養物からフルクトシルアミン酸化酵素を採取するフルクトシルアミン酸化酵素の製造方法。

【請求項10】請求項9記載の方法で製造されたフルクトシルアミン酸化酵素。

【請求項11】請求項1～10のいずれかに記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルアミン化合物類の分光学的分析方法。

【請求項12】請求項1～11のいずれかに記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルアミン化合物類の電気化学的分析法。

【請求項13】HbA1cをアッセイする方法であって、試料中のHbA1cを分解してフルクトシルバリンを生成し、前記フルクトシルバリンを請求項1～10記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて定量することを含む分光学的分析方法。

【請求項14】請求項1～10記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルバリ分光学的アッセイキット。

【請求項15】請求項1～10記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含むHbA1c分光学的分析方法アッセイキット。

【請求項16】請求項1～10記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、フルクトシルバリンの電気化学的分析法。

【請求項17】請求項1～10記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いるこ

とを特徴とする、HbA1cの電気化学的分析法。

【請求項18】請求項16ならびに17記載の電気化学的分析法を特徴とする酵素電極。

【請求項19】請求項18記載の酵素電極を用いることを特徴とする酵素センサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なフルクトシルアミン酸化酵素（FAO）に関する。より詳細には、本発明は新規微生物の産生するフルクトシルアミン酸化酵素、ならびにその製造に関する。また、本発明はフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子、該FAOをコードする遺伝子断片を組み込んでなる組み換えベクター、該組み換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養することによるFAOの製造方法に関する。また、本発明は、本発明によって生産されるフルクトシルアミン酸化酵素を用いたHbA1cおよびフルクトシルバリン計測キットならびにセンサーに関する。

【0002】

【従来の技術】

蛋白質主鎖および側鎖のアミノ基はグルコースなどの還元糖の還元末端と非酵素的に結合して、アマトリ化合物すなわち糖化蛋白質を生ずる。血中においては、ヘモグロビンが糖化されて糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビン；HbA1c）を生ずることが知られている。糖尿病患者では健常人に比べてヘモグロビンに対するHbA1cの存在比率が高いこと、およびHbA1cの血中濃度は過去数週間の血糖値を反映することから、HbA1c血中濃度は糖尿病の診断および糖尿病患者の血糖コントロールの指標として、臨床試験において極めて重要である。

【0003】

HbA1cにおいては、ヘモグロビンβ鎖のN末端のバリンにグルコースが結合していることから、フルクトシルバリンをHbA1cの低分子モデル化合物と

して用いることができる。すなわち、フルクトシルバリンに対して特異性を有する酵素を用いて、HbA1cをアッセイすることが可能である。

【0004】

これまでに、種々の菌株からアマドリ化合物に対して作用する酵素が単離されており、これらの酵素を用いてグリコアルブミン、HbA1cおよびフルクトサミン等の糖化蛋白質を分析しうることが示唆されている（特開昭61-268178、特開昭61-280297、特開平3-155780、特開平5-192193、特開平7-289253、特開平8-154672、Agric. Biol. Chem., 53 (1), 103-110, 1989、Agric. Biol. Chem., 55 (2), 333-338, 1991、J. Biol. Chem., 269 (44), 27297-27302, 1994、Appl. Environ. Microbiol., 61 (12), 4487-4489, 1995、Biosci. Biotech. Biochem., 59 (3), 487-491, 1995、J. Biol. Chem., 270 (1), 218-224, 1995、J. Biol. Chem., 271 (51), 32803-32809, 1996、J. Biol. Chem., 272 (6), 3437-3443, 1997)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、フルクトシルバリンと反応しうる新規フルクトシルアミン酸化酵素の構造遺伝子をクローニングし、さらにアミノ酸配列を明らかにすること、およびその情報に従い組換えDNA技術を用い該酵素の製造方法ならびにこれを用いる分析方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記目的を達成するために種々検討した結果、フルクトシルアミン酸化酵素 (FAO) をコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターにより微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、該培養物からFAOを採取することによってFAOを大量生産できることを見いだし、本発明に至った。

【0007】

すなわち本発明はFAOをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターで微生物を形質転換することによって得られることを特徴とする形質転換体を培養して培養物からFAOを採取することを特徴とするFAOの製造方法である。

【0008】

本発明は以下の(a)または(b)のフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質である。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質

【0009】

また本発明は以下の(a)または(b)の蛋白質であるフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子である。

(a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質

【0010】

また本発明は以下の(c)または(d)の配列であり、フルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子である。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0011】

また本発明は配列 GlyPhePhePhcGluAlaAspGluAsn
AsnGLuIleLysを含むフルクトシルアミン酸化酵素。

【0012】

本発明は以下のe)～h)のいずれかの配列を有することを特徴とするフルクトシルアミン酸化酵素である。

e) P h e H i s T y r A s p T y r V a l A l a P r o L e u A l a L y s
P r o A s n S e r L y s G l u A r g

f) A s p A l a P r o L e u L e u H i s A s p L y s G l u T y r T y r
G l u G l u L e u G l n L y s -

- A s n G l y L e u A r g A s n T y r A r g T y r I l c S e r T h r
g) T h r L y s G l y A s p L y s G l y L e u A s p P r o G l u A s p
L y s

h) T r p V a l S e r V a l G l u A s n P r o T h r P r o H i s L y s
L e u G l u

【0013】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】において *P i c h i a* sp.
N1-1株（独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター 寄託番号
FERM P-17326）または *P i c h i a* 属由来であるフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子である。

【0014】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】においてフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子を含有する組み換えベクターである。

【0015】

また本発明は上記【0014】に記載の組み換えベクターで形質転換した形質転換体または形質導入体である。

【0016】

また本発明は上記【0015】に記載の形質転換体を培養して、該培養物からフルクトシルアミン酸化酵素を採取するフルクトシルアミン酸化酵素の製造方法を提供する。

【0017】

また本発明は上記【0016】において記載の方法で製造されたフルクトシルア

ミン酸化酵素である。

【0018】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルアミン化合物類の分光学的分析方法を提供する。

【0019】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルアミン化合物類の電気化学的分析法を提供する。

【0020】

また本発明はHbA1cをアッセイする方法であって、試料中のHbA1cを分解してフルクトシルバリンを生成し、前記フルクトシルバリンを【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて定量することを含む分光学的分析方法を提供する。

【0021】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を含むフルクトシルバリン分光学的アッセイキットを提供する。

【0022】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を含むHbA1c分光学的分析方法アッセイキットを提供する。

【0023】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、フルクトシルバリンの電気化学的分析法を提供する。

【0024】

また本発明は上記記載【0008】～【0012】のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、HbA1cの電気化学的分析法、ならびにその電気化学的分析法を特徴とする酵素電極、およびその酵素電極を用いることを特徴とする酵素センサーを提供する。

【0025】

【発明の実施の形態】

【0026】

フルクトシルアミン酸

【0027】

これまでに酵母および *Pichia* 属からのフルクトシルアミン酸化酵素の構造遺伝子の報告はない。したがって本酵素の構造遺伝子、アミノ酸配列は新規であり、その組み換えDNA技術を用いた製造方法は新規方法である。

【0028】

遺伝子の調製方法

本発明のFAOをコードする遺伝子を含むDNA断片はFAO生産菌から得ることができる。該FAO生産菌としては具体的には *Pichia* 株は *Pichia pastoris* が適している

【0029】

さらに本発明のFAOをコードする遺伝子を含む該FAO生産菌としては *Pichia acaciae*, *Pichia alni*, *Pichia ambrosiae*, *Pichia Americana*, *Pichia amylophila*, *Pichia angophorae*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia barkeri*, *Pichia besscyi*, *Pichia bimundalis*, *Pichia bispora*, *Pichia bovis*, *Pichia burtonii*, *Pichia cactophila*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulate*, *Pichia castillac*, *Pichia chambardii*, *Pichia ciferrii*, *Pichia delftensis*, *Pichia deserticola*, *Pichia diana*, *Pichia dorogensis*, *Pichia dryadoides*, *Pichia etchellsii*, *Pichia euphorbiae*, *Pichia euphorbiiphila*, *Pichia fabianii*, *Pichia farinose*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia fluxuum*, *Pichia galeiformis*, *Pichia gl*

ucozyma, *Pichia guilliermondii*, *Pichia hampshirensis*, *Pichia haplophila*, *Pichia hawaiiensis*, *Pichia heedii*, *Pichia heimii*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia inositovora*, *Pichia jadinii* (Torulayeast), *Pichia japonica*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kodamae*, *Pichia lachancei*, *Pichia lynferdii*, *Pichia macluriae*, *Pichia manshurica*, *Pichia media*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia methylovora*, *Pichia mexicana*, *Pichia meyeriae*, *Pichia minuta*, *Pichia mississippiensis*, *Pichia misumaiensis*, *Pichia naganishii*, *Pichia nakasei*, *Pichia nakazawae*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ofunaensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia onychis*, *Pichia petersonii*, *Pichia philodendra*, *Pichia philogaea*, *Pichia pijperi*, *Pichia pilisensis*, *Pichia pinus*, *Pichia populi*, *Pichia pseudocactophila*, *Pichia pseudopastoris*, *Pichia quercuum*, *Pichia rabaulensis*, *Pichia ramenticola*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia salicis*, *Pichia salictaria*, *Pichia scolyti*, *Pichia segobiensis*, *Pichia silvicola*, *Pichia spartinae*, *Pichia sporocuriosa*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia sydowiorum*, *Pichia tannicola*, *Pichia*

toletana, *Pichia trehaloabstinens*, *Pichia trehalophila*, *Pichia triangularis*, *Pichia veronae*, *Pichia wickerhamii*, *Pichia xylosa*, *Pichia zsoltyi*等の酵母をあげることができる。

【0030】なかでも *Pichia* sp. N1-1株（独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター 寄託番号FERM P-17326）由来のFAOをコードする遺伝子が好ましい。

【0031】

該FAOをコードする遺伝子はこれらの菌株から抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらにPCR法の利用によりFAO遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

【0032】

上記FAOをコードする遺伝子としては、例えば（a）配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子、または（b）アミノ酸配列（a）において1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつFAO活性を有するタンパク質であるFAOをコードする遺伝子が挙げられる。

【0033】

さらに、（c）配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA、または（d）上記（c）の配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつFAO活性を有するタンパク質をコードしているDNAがある。

【0034】

本発明において、FAOをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えば染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアな発現ベクターと両DNAをの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、

ベクターのマーカと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、FAOをコードする遺伝子を含む組換えベクターを保持する微生物を得る。

【0035】

次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからFAOをコードする遺伝子を取り出すことができる。例えば、遺伝子供与体である染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

【0036】

該遺伝子供与微生物を例えば1～3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりFAO遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

【0037】

上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

【0038】

微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0039】

クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えば*Escherichia coli*を宿主微生物とする場合には*Lambda gt10*、*Lambda gt11*などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、*Escherichia coli*を

宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC18、pUC118、pUC119、pUC119、pTrc99A、pBluescript、pET28あるいはコスミドであるSuperCosIなどが例示される。

【0040】

クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したFAOをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

【0041】

クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるのであれば特に制限されない。一般的には、*Escherichia coli* DH5 α 、XL-1BlueMR、*Escherichia coli* BL21などを用いることができる。また本酵素が酵母*Pichia*由来であることから、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastorius*などの真核微生物を宿主として用いることができる。

【0042】

宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物が*Escherichia coli*の場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

【0043】

上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のFAOを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性

マーカーとFAO活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつFAOを生成する微生物を選択すればよい。

【0044】

また別の観点においては単離精製されたFAOのアミノ酸配列を決定し、その情報をもとに該菌株から調製したcDNAおよびゲノムDNAからFAO構造遺伝子をクローニングすることもできる。

【0045】

N1-1株のcDNAの調製は以下のようにして行う。まず、N1-1株からmRNAを抽出する。N1-1株をYM培地で前培養(30℃、5ml、L字管)後、fructosyl valine:FV(終濃度0.48%)を唯一の窒素源として加えたM9最小培地(M9/FV)に1%植菌した(初期濃度0.01、30℃、100ml、500mlバッフル)。OD₆₆₀=3付近で集菌(5,000g、15min、4℃)後、200μl buffer A(1Mソルビトール、100mM EDTA、14mMメルカプトエタノール)を加え懸濁した。20μl ザイモリエイス溶液(1000Uザイモリエイス/1ml buffer A)を加え混和後、30℃、30min静置した。遠心(15,000rpm、10min、4℃)後、沈殿をISOGEN 1mlにより懸濁し、室温、5min静置した。0.2mlのクロロホルムを加え混和後、室温、3min静置した。遠心(15,000rpm、15min、4℃)後、水相に0.5ml イソプロパノールを加え混和し、室温、10min静置した。遠心(15,000rpm、10min、4℃)後、沈殿に1ml 70%エタノールを加え混和した。遠心(15,000rpm、5min、4℃)後、沈殿を15min真空乾燥した。ここで得られたmRNAをから該cDNAを合成できる。

すなわち、mRNAをもとにRT-PCRによるcDNAを調製する常法においてFAO構造遺伝子を含む断片の増幅が行える。まず、mRNAに対して、RNA-PCR kit (AMV Ver. 2.1 takara)のマニュアルに従い、オリゴdTアダプタープライマーを用い逆転写反応を行った。得られたcDNAをエタノール沈殿法により精製後、これをテンプレートとしてPCRを行

った。PCRプライマーには、既報のFAODsの保存配列よりデザインしたFAO-F1と、N1-1株由来FAODのアミノ酸配列解析より得られたアミノ酸13残基よりデザインしたFAO-R2を用いることができる。

FAO-F1 5' -GGXACXTGGGGXWSXWSXACXGCTXYTXXCA-3'

FAO-R2 3' -TCYTCRTYXGGYTCAVWRAARAAXCC-5'

ただし S=C+G Y=C+T R=A+G X=A+C+G+TW=A+TV
=A+C+G

これを以下の反応条件でPCR増幅を行った。

94℃ 1分

60℃ 30秒

72℃ 30秒

以上を1サイクル

98℃ 30秒

60℃ 30秒

72℃ 7分

72℃ 8分

以上を25サイクル

Taqポリメラーゼは、TaKaRa LA Taq™を用いた。このようにして得られたPCR産物をGENECLEAN II Kit付属のマニュアルに従いグラスミルク精製後、pGEM-T Vector System付属のマニュアルに従いサブクロニングし、カラーセクションにより、インサートを有するベクターを保持する形質転換体を得た。得られた形質転換体をLB培地で培養(37℃、1.8ml、試験管)し、集菌、プラスミド抽出を行った。得られたプラスミドをM13プライマーフォワード、M13プライマーリバーズ(タカラバイオ(株))を用い、インサートの塩基配列解析を行った。サンプルの調整方法、解析法などはABIプリズム310ジェネティックアナライザー(パーキンエルマーアプライドバイオシステム社)付属のマニュアルにしたがった。

【0046】

次に、C末端付近の塩基配列を解析するためにPCRを行った。前項で得られた精製後のcDNAをテンプレートとしてPCRを行った。PCRプライマーには、インサートの塩基配列解析から得られた配列よりデザインしたFAO-F3と、アダプタープライマー配列を用いることができる。

FAO-F3: 5' -ATTTCAAAGTGACGGATGAAGAAGCTAAAG-3'

adapter primer: 3' -CGCAGTTTTCCAGTCACGAC-5'

このようにして得られたcDNAより求められたFAOの内部部分配列情報をもとに、N1-1株のゲノムDNAを鋳型としてインバースPCRによって、本酵素の構造遺伝子全長をクローニングできる。

【0047】

N1-1株からのゲノムDNAは以下のように抽出した。N1-1株をYM培地で培養(30℃、100ml、300mlバッフル)後、25ml培養液に対し、25mlエタノール、1ml 0.5M EDTAを加え、-30℃、30min静置した。集菌(5,000G、15min、4℃)後、1ml滅菌超純水を加え懸濁した。遠心(8,000rpm、5min、4℃)後、沈殿に0.5ml スフェロプラストbuffer(1.2Mソルビトール、0.1M EDTA) 1%メルカプトエタノール、0.1%ザイモリエイス)を加え懸濁し、37℃、30min静置した。0.5ml Proteinase K buffer(50mM EDTA、0.3% SDS、0.01% proteinase K)を加え混和後、65℃、30min静置した。0.2mlの5M酢酸カリウムを加え混和後、氷上にて10min静置した。遠心(10,000rpm、15min、4℃)後、上清を用いてエタノール沈殿法を行い、沈殿を15min真空乾燥した。沈殿を500μlのTE buffer(10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)に溶解後、5μlのRNaseを加え混和し、37℃、30min静置した。

その後フェノール・クロロホルム抽出法、エタノール沈殿法を行った。沈殿を真

空乾燥後、1ml滅菌超純水に溶解した。

【0048】

このようにして得られたN1-1株由来ゲノムDNAに対してインバースPCRによるFAOD構造遺伝子断片の増幅が行える。得られたゲノムDNAを制限酵素消化後、DNA Ligation Kit Ver. 2付属のマニュアルに従い、セルフライゲーションを行った。得られた環状DNAをテンプレートとし、PCRを行った。プライマーにはFAO構造遺伝子の部分配列よりデザインしたプライマーFAO-F5及びFAO-R6を用いた。

FAO-F5 5'-GTGCATACGAAGAATGCAAACGATTGGAGTGG-3'

FAO-R6 3'-CCATCCGTTATCTCCGTCGAGAACATATCCTC-5'

これを以下の反応条件でPCR増幅を行った。

94℃ 1分

60℃ 30秒

72℃ 30秒

以上を1サイクル

98℃ 30秒

60℃ 30秒

72℃ 7分

72℃ 8分

以上を25サイクル

Taqポリメラーゼは、TaKaRa LA Taq™を用いた。

このようにして得られたPCR産物を再び精製し、その塩基配列を情報に従い解析する。

【0049】

このようにして得られるPCR増幅断片の塩基配列を解析することにより目的遺伝子が得られる。これらの情報から得られたFAO遺伝子配列情報をもとに、この全長断片を含む遺伝子をN1-1ゲノムDNAからPCR増幅により調製でき

る。すなわち、同遺伝子領域を含む配列を増幅するために

FAO-NcoI: 5' -ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-XbaI: 3' -TTGATTCTAGACATGTATGTTGTATCTTG-5'

をデザインした。これらを上記のPCRサイクルによって反応することにより、目的断片を含むゲノムDNAを増幅できる。

反応条件は以下のサイクルで行った。

94℃	5分	
94℃	30秒	} 25 サイクル
55℃	30秒	
72℃	1分	
72℃	5分	

上記の方法により得られたFAO遺伝子の塩基配列は、常法により全自動塩基配列解析装置により解読した。また、FAOのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

【0050】

上記のようにして、一度選択されたFAO遺伝子を保有する組換えベクターより、微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、FAO遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりFAO遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

【0051】

また、大腸菌をもちいてN1-1株由来FAOの組み換え生産がおこなえる。得られたN1-1株由来FAODの構造遺伝子配列情報からN末端、C末端に相補的なプライマーをデザインした。この際、N末端側のプライマーにはNcoI (FAO-NcoI)、C末端側のプライマーにはXbaI (FAO-XbaI) を付加した。

FAO-NcoI: 5' -ATCACCATGGAGTCGATAATTATA
GTTGG-3'

FAO-XbaI: 3' -TTGATTCTAGACATGTATGTTGTA
ATCTTG-5'

上記記載の方法により得られたcDNA、あるいはゲノムDNAをテンプレートとし、上記のプライマーを用いてPCRによりFAOD構造遺伝子を増幅した。得られたPCR産物をNcoI、XbaI消化し、同制限酵素消化した高発現ベクターpTrc99a (Invitrogen社) とライゲーション (DNA Ligation Kit Ver. 2) プラスミド (pTN1) を作成できる。このようにして作成されたpTN1を大腸菌に形質転換することにより、組み換えFAODの生産量が行える。

【0052】

形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0053】

例えばpTN1を用いて大腸菌DH5 α を形質転換し、LB培地により培養 (30℃、150ml) バッフル、アンピシリン50 μ g/ml) 後、OD₆₆₀=0.7付近でIPTG (終濃度0.3mM) を加えた。その後、培養温度を30℃に下げ、1時間ごとに2mlずつ集菌した。得られた菌体を超音波破碎し、破碎液上清を用いてFAOD活性測定を行い、Lあたりの生産量 (U/L culture) を算出した。測定にはFV (2mM)、PPb (pH7.0、50mM)、Phenol (1.5mM)、4アミノアンチピリン (1.5mM)、ペルオキシダーゼ (2U/ml) を用いてPOD/Phenol/4A.A. 法により505nmの吸光度の変化を測定することにより行った。

【0054】

組み換えFAOの精製は以下のように行える。まず、組み換え大腸菌から該酵素を含む水溶性画分を調製する。pTN1/DH5 α をLB培地により培養 (37℃、71、101ファーマンター、アンピシリン50 μ g/ml) し、OD₆₆₀

0 = 0.7 付近で IPTG (終濃度 0.3 mM) によりインダクションをかけ、培養温度を 30℃ に下げた。得られた菌体を 100 mM PPb (pH 7.0) に懸濁し、フレンチプレスにより 4 回破碎を行った。破碎液上清を超遠心 (40,000 g、90 min) し、上清を 10 mM PPb (pH 7.0) により一晚、4℃ にて透析し、水溶性画分を調製できる。さらにえられた水溶性画分を以下のように液体クロマトグラフィーに供することにより精製酵素を調製できる。

【0055】

まず、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-5PW) を行う。10 mM PPb (pH 7.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム DEAE-5PW (5.0 mm I. D. × 5 cm、トーソー (株)) に、得られた水溶性画分を吸着させた。カラム容量 3 倍量の 10 mM PPb (pH 7.0) で平衡化した後、0.7 M の NaCl を含む 10 mM PPb (pH 7.0) で FAOD を溶出させた。流速は 1 ml/min とし、一分ごとに溶出液の回収を行った。溶出物の検出には 280 nm の吸光波長を用いた。得られた活性画分を 35% 硫酸アンモニウムを含む 10 mM PPb (pH 6.5) で平衡化した疎水カラムクロマトグラフィー用充填カラム Resource Phe (1 ml、ファルマシア (株)) に、上記記載の活性画分を吸着させた。カラム容量 3 倍量の 35% 硫酸アンモニウムを含む 10 mM PPb (pH 6.5) で平衡化した後、10 mM PPb (pH 6.5) を用いて FAOD を溶出させた。流速は 2 ml/min とし、1 分ごとに溶出物の回収を行った。得られた活性画分を 45% 硫酸アンモニウムを含む 10 mM PPb (pH 7.0) に溶解後、同緩衝液により 6 時間、4℃ にて透析を行った。さらに 100 μM FAD を含む 10 mM PPb (pH 8.0) により 6 時間、4℃ にて透析を行った。透析後のサンプルを次の陰イオン交換クロマトグラフィーに供する。10 mM PPb (pH 8.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム Bioasit Q (4.6 mm I. D. × 5 cm、トーソー (株)) に、上記で得られたサンプルを吸着させた。カラム容量 3 倍量の 10 mM PPb (pH 8.0) で平衡化した後、0.3 M の NaCl を含む 10 mM PPb

(pH 7.0) で F A O D を溶出させた。流速は 1 ml/min とし、一分ごとに溶出液の回収を行った。得られた活性画分を 10 mMPPb (pH 7.0) により、一晚、 4°C にて透析した。このようにして得られた試料の精製度は SDS/PAGE により検定できる。ファストゲル 8-25 を用いて電気泳動を行い、サンプル泳動後のゲルを銀染色した。サンプルの調製方法、泳動法、染色方法は *phast System*™ 付属のマニュアルにしたがった

【0056】

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。

【0057】

本酵素を用いてフルクトシルバリン計測キットを構築できる。本発明に従うフルクトシルアミン酸化酵素に加えて、計測に必要な緩衝液、適当なメディエーター、および必要な場合にはペルオキシダーゼ等の酵素、キャリブレーションカーブ作製のためのフルクトシルバリンもしくはその誘導体の標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従うフルクトシルアミン酸化酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

【0058】

さらに本発明の酵素を用いては H b A 1 c アッセイキットを構築できる。H b A 1 c を酵素的または化学的に分解することによりフルクトシルバリンが生成し、これを本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて定量することにより H b A 1 c をアッセイすることができる。したがって、本発明の H b A 1 c アッセイキットは、上述のフルクトシルバリン計測キットにさらに加水分解試薬または蛋白質分解酵素を含む。

【0059】

また、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて、フルクトシルバリン計測用センサーおよび H b A 1 c 計測用センサーを構築できる。すなわち、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素の作用により消費される酸素または発生する過酸化水素を計測することにより、基質であるフルクトシルバリンの濃度を決定する

ことができる。酸素または過酸化水素を測定する種々のセンサー系が当該技術分野において知られている。電極としては、酸素電極、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、これらを組み合わせて用いてもよい。

【0060】

酸素電極を用いる場合には、電極表面に本発明の酵素を固定化して、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。ここに試料を加えて電流の減少値を測定する。

カーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する場合には、作用電極として酵素を固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えば Ag/AgCl 電極）とともに、メディエーターを含む緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。

【0061】

さらにカーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する方法として、固定化電子メディエータを用いる系がある。すなわち、作用電極として酵素およびフェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどの電子メディエータを吸着あるいは共有結合により高分子マトリックスに固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えば Ag/AgCl 電極）とともに、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。

【0062】

いずれの電極を用いる場合にも、標準濃度のフルクトシルバリン溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のフルクトシルバリン濃度を求めることができる。

【0063】

HbA1c計測用センサーとして用いる場合は、上述のフルクトシルバリン計測用センサーに、さらに蛋白質分解酵素（例えばプロテアーゼ）を固定化した膜などを組み合わせて、複合センサーを構築する。このような、複数の酵素の組み合わせによる連続的反応を用いる複合センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えばBiosensors-Fundamental and Applications-Anthony P. F. Tuner, Isao Karube and Geroge S. Wilson, Oxford University Press 1987に記載されている。

【0064】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0065】

実施例1FAOの内部アミノ酸配列の決定

既報の文献“Screening and Characterization of Fructosyl-valine utilizing Marine Microorganisms” K. Sode et al., Mar. Biotechnol., 3, 126-132 (2001)に従い、当該株を培養した。Pichia sp. N1-1株由来FAOの精製酵素を得た。この精製酵素のサンプルを凍結乾燥後、145 μ gの試料にたいしタンパク濃度2mg/mlとなるように超純水を加えた。この試料についてラピダス・スラブ電気泳動装置を用いてSDS-PAGE (10%ポリアクリルアミドゲル)を行った。SDS-PAGE後のゲルを5×5cmの大きさに切り出し、ファストシステムTMを用いてPVDF膜へのブロッティングを2h行った。このPVDF膜をクーマシーブルーで染色後、目的のバンドを切り出した。こうして得られた酵素をトリプシンで消化し、これを逆相液体クロマトグラフィーにより分離した。得られた解析パターンの一つのフラクションをアミノ酸シーケンサー（島津製作所製

、PPSQ-10)により内部アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本酵素にはGlyPhePhePheGluAlaAspGluAsnAsnGluIleLysから構成されるペプチド配列を含むことが明らかとなった。

【0066】

実施例2

FAOをコードする遺伝子のクローニング

N1-1株のcDNAの調製は以下のようにして行う。まず、N1-1株からmRNAを抽出する。N1-1株をYM培地で前培養(30℃、5ml、L字管)後、fructosyl valinc:FV(終濃度0.48%)を唯一の窒素源として加えたM9最小培地(M9/FV)に1%植菌した(初期濃度0.01、30℃、100ml、500mlバッフル)。OD₆₆₀=3付近で集菌(5,000g、15min、4℃)後、200μl buffer A(1Mソルビトール、100mM EDTA、14mMメルカプトエタノール)を加え懸濁した。20μlザイモリエイス溶液(1000Uザイモリエイス/1ml buffer A)を加え混和後、30℃、30min静置した。遠心(15,000rpm、10min、4℃)後、沈殿をISOGEN 1mlにより懸濁し、室温、5min静置した。0.2mlのクロロホルムを加え混和後、室温、3min静置した。遠心(15,000rpm、15min、4℃)後、水相に0.5mlイソプロパノールを加え混和し、室温、10min静置した。遠心(15,000rpm、10min、4℃)後、沈殿に1ml70%エタノールを加え混和した。遠心(15,000rpm、5min、4℃)後、沈殿を15min真空乾燥した。ここで得られたmRNAをから該cDNAを合成できる。

すなわち、mRNAをもとにRT-PCRによるcDNAを調製する常法においてFAO構造遺伝子を含む断片の増幅が行える。まず、mRNAに対して、RNA-PCR kit(AMV Ver. 2.1 takara)のマニュアルに従い、オリゴdTアダプタープライマーを用い逆転写反応を行った。得られたcDNAをエタノール沈殿法により精製後、これをテンプレートとしてPCRを行った。PCRプライマーには、既報のFAODsの保存配列よりデザインしたFAO-F1と、N1-1株由来FAODのアミノ酸配列解析より得られたアミノ

酸13残基よりデザインしたFAO-R2を用いることができる。

FAO-F15' -GGXACXTGGGGXWSXWSXACXGCXYTX
CA-3'

FAO-R2 3' -TCYTCRTYXGGYTCTVAWRARAAXCC
-5'

ただしS=C+G Y=C+T R=A+G X=A+C+G+TW=A+TV
=A+C+G

これを以下の反応条件でPCR増幅を行った。

94℃ 1分

60℃ 30秒

72℃ 30秒

以上を1サイクル

98℃ 30秒

60℃ 30秒

72℃ 7分

72℃ 8分

以上を25サイクル

Taqポリメラーゼは、TaKaRa LA Taq™を用いた。このようにして得られたPCR産物をGENECLEAN II Kit 付属のマニュアルに従いガラスミルク精製後、pGEM-T Vector System 付属のマニュアルに従いサブクローニングし、カラーセクションにより、インサートを有するベクターを保持する形質転換体を得た。得られた形質転換体をLB培地で培養(37℃、1.8ml、試験管)し、集菌、プラスミド抽出を行った。得られたプラスミドをM13プライマーフォワード、M13プライマーリバーズ(タカラバイオ(株))を用い、インサートの塩基配列解析を行った。サンプルの調整方法、解析法などはABIプリズム310ジェネティックアナライザー(パーキンエルマーアプライドバイオシステム社) 付属のマニュアルにしたがった。

次に、C末端付近の塩基配列を解析するためにPCRを行った。前項で得られた精製後のcDNAをテンプレートとしてPCRを行った。PCRプライマーには

、インサートの塩基配列解析から得られた配列よりデザインしたFAO-F3と、アダプタープライマー配列を用いることができる。

FAO-F3: 5' -ATTTCAAAGTGACGGATGAAGAAGCTAAAG-3'

adapter primer: 3' -CGCAGTTTTCCAGTCACGAC-5'

このようにして得られたcDNAより求められたFAOの内部部分配列情報をもとに、N1-1株のゲノムDNAを鋳型としてインバースPCRによって、本酵素の構造遺伝子全長をクローニングできる。

N1-1株からのゲノムDNAは以下のように抽出した。N1-1株をYM培地で培養(30℃、100ml、300mlバッフル)後、25ml培養液に対し、25mlエタノール、1ml 0.5M EDTAを加え、-30℃、30min静置した。集菌(5,000G、15min、4℃)後、1ml滅菌超純水を加え懸濁した。遠心(8,000rpm、5min、4℃)後、沈殿に0.5mlスフェロプラストbuffer(1.2Mソルビトール、0.1M EDTA、1%メルカプトエタノール、0.1%ザイモリエイス)を加え懸濁し、37℃、30min静置した。0.5ml Proteinase K buffer(50mM EDTA、0.3%SDS、0.01%proteinase K)を加え混和後、65℃、30min静置した。0.2mlの5M酢酸カリウムを加え混和後、氷上にて10min静置した。遠心(10,000rpm、15min、4℃)後、上清を用いてエタノール沈殿法を行い、沈殿を15min真空乾燥した。沈殿を500μlのTE buffer(10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)に溶解後、5μlのRNaseを加え混和し、37℃、30min静置した。その後フェノール・クロロホルム抽出法、エタノール沈殿法を行った。沈殿を真空乾燥後、1ml滅菌超純水に溶解した。

このようにして得られたN1-1株由来ゲノムDNAに対してインバースPCRによるFAOD構造遺伝子断片の増幅が行える。得られたゲノムDNAを制限酵素消化後、DNA Ligation Kit Ver. 2付属のマニュアル

に従い、セルフライゲーションを行った。得られた環状DNAをテンプレートとし、PCRを行った。プライマーにはFAO構造遺伝子の部分配列よりデザインしたプライマーFAO-F5及びFAO-R6を用いた。

FAO-F5 5' -GTGCATACGAAGAATGCAAACGATTG
GGAGTGG-3'

FAO-R6 3' -CCATCCGTTATCTCCGTCGAGAACAT
ATCCTC-5'

これを以下の反応条件でPCR増幅を行った。

94℃ 1分

60℃ 30秒

72℃ 30秒

以上を1サイクル

98℃ 30秒

60℃ 30秒

72℃ 7分

72℃ 8分

以上を25サイクル

Taqポリメラーゼは、TaKaRa LA Taq™を用いた。

このようにして得られたPCR産物を再び精製し、その塩基配列を情報に従い解析する。

このようにして得られるPCR増幅断片の塩基配列を解析することにより目的遺伝子が得られる。これらの情報から得られたFAO遺伝子配列情報をもとに、この全長断片を含む遺伝子をN1-1ゲノムDNAからPCR増幅により調製できる。すなわち、同遺伝子領域を含む配列を増幅するために

FAO-Ncol: 5' -ATCACCATGGAGTCGATAATTATAG
TTGG-3'

FAO-Xba1: 3' -TTGATTCTAGACATGTATGTTGTA
ATCTTG-5'

をデザインした。これらを上記のPCRサイクルによって反応することにより、

目的断片を含むゲノムDNAを増幅できる。

反応条件は以下のサイクルで行った。

94°C	5分	
94°C	30秒	} 25サイクル
55°C	30秒	
72°C	1分	
72°C	5分	

上記の方法により得られたFAO遺伝子の塩基配列は、常法により全自動塩基配列解析装置により解読した。また、FAOのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

【0067】

実施例3

組換え生産用ベクターの構築

上記のようにして、一度選択されたFAO遺伝子を保有する組換えベクターより、微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、FAO遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりFAO遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

また、大腸菌をもちいてN1-1株由来FAOの組み換え生産がおこなえる。得られたN1-1株由来FAOの構造遺伝子配列情報からN末端、C末端に相補的なプライマーをデザインした。この際、N末端側のプライマーにはNco I (FAO-Nco I)、C末端側のプライマーにはXba I (FAO-Xba I) を付加した。

FAO-Nco I : 5' -ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-Xba I : 3' -TTGATTCTAGACATGTATGTTGTATCTTG-5'

上記記載の方法により得られたcDNA、あるいはゲノムDNAをテンプレート

とし、上記のプライマーを用いてPCRによりFAOD構造遺伝子を増幅した。得られたPCR産物をNcoI、XbaI消化し、同制限酵素消化した高発現ベクターpTrc99a (Invitrogen社) とライゲーション (DNA Ligation Kit Ver. 2) プラスミド (pTN1) を作成できる。このようにして作成されたpTN1を大腸菌に形質転換することにより、組み換えFAODの生産量が行える。

【0068】

実施例4

組み換え大腸菌によるFAOの生産

FAOの構造遺伝子を含むプラスミドpTN1が形質転換されている大腸菌、*Escherichia coli* DH5 α /pTN1を用いてFAOの生産を行った。当該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB培地3mlに植菌し、37℃で12時間培養を行い、遠心分離機により細胞を集菌した。この細胞をフレンチプレス (1500kgf) で破碎した後、超遠心 (4℃、160,400 \times g、90分) により上清の水溶性画分 (10mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0) を分離した。このようにして調製された形質転換大腸菌は細胞内にFAOを発現した。野性型*Pichia* sp. N1-1をもちいて該酵素を生産する場合には市販されておらず、かつ入手が困難で高価であるフルクトシルアミン化合物を培地に添加しなければ該酵素は誘導されず生産ができないが、本組換え法では従来、大腸菌組換え技術で用いられているIPTGを用いて誘導すれば酵素生産は誘導でき、経済的である。また、その生産量は野性型*Pichia* sp. N1-1株を用いてフルクトシルバリンを用いて誘導生産したときに比べ、単位蛋白質あたり1.5倍以上であった。(表xx)

【0069】

実施例5

酵素の精製

組み換えFAOの精製は以下のように行える。まず、組み換え大腸菌から該酵素を含む水溶性画分を調製する。pTN1/DH5 α をLB培地により培養 (37℃、71、101ファーマンター、アンピシリン50 μ g/ml) し、OD₆₆₀

0 = 0.7付近でIPTG (終濃度0.3 mM) によりインダクションをかけ、培養温度を30℃に下げた。得られた菌体を100 mM PPb (pH 7.0) に懸濁し、フレンチプレスにより4回破碎を行った。破碎液上清を超遠心 (40,000 g、90 min) し、上清を10 mM PPb (pH 7.0) により一晩、4℃にて透析し、水溶性画分を調製できる。さらにえられた水溶性画分を以下のように液体クロマトグラフィーに供することにより精製酵素を調製できる。まず、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-5PW) を行う。10 mM PPb (pH 7.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム DEAE-5PW (5.0 mm I.D. × 5 cm、トーソー (株)) に、得られた水溶性画分を吸着させた。カラム容量3倍量の10 mM PPb (pH 7.0) で平衡化した後、0.7 MのNaClを含む10 mM PPb (pH 7.0) でFAODを溶出させた。流速は1 ml/minとし、一分ごとに溶出液の回収を行った。溶出物の検出には280 nmの吸光波長を用いた。得られた活性画分を35%硫酸アンモニウムを含む10 mM PPb (pH 6.5) で平衡化した疎水カラムクロマトグラフィー用充填カラムResource Phe (1 ml、ファルマシア (株)) に、上記記載の活性画分を吸着させた。カラム容量3倍量の35%硫酸アンモニウムを含む10 mM PPb (pH 6.5) で平衡化した後、10 mM PPb (pH 6.5) を用いてFAODを溶出させた。流速は2 ml/minとし、1分ごとに溶出物の回収を行った。得られた活性画分を45%硫酸アンモニウムを含む10 mM PPb (pH 7.0) に溶解後、同緩衝液により6時間、4℃にて透析を行った。さらに100 μM FADを含む10 mM PPb (pH 8.0) により6時間、4℃にて透析を行った。透析後のサンプルを次の陰イオン交換クロマトグラフィーに供する。10 mM PPb (pH 8.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラムBioasit Q (4.6 mm I.D. × 5 cm、トーソー (株)) に、上記で得られたサンプルを吸着させた。カラム容量3倍量の10 mM PPb (pH 8.0) で平衡化した後、0.3 MのNaClを含む10 mM PPb (pH 7.0) でFAODを溶出させた。流速は1 ml/minとし、

一分ごとに溶出液の回収を行った。得られた活性画分を 10 mM PPb (pH 7.0) により、一晚、4℃にて透析した。このようにして得られた試料の精製度は SDS/PAGE により検定できる。ファストゲル 8-25 を用いて電気泳動を行い、サンプル泳動後のゲルを銀染色した。サンプルの調製方法、泳動法、染色方法は Phast SystemTM 付属のマニュアルにしたがった。精製された酵素の電気泳動写真を図 xx に示す。

【0070】

実施例 6

酵素活性の検討

実施例 5 で得られた精製酵素を用いて、fructosyl valine、N ϵ -fructosyl lysine、fructosyl glycine、fructosyl alanine、fructosyl leucine、fructosyl phenylalanine、グルコース、サルコシンに対する反応性の検討を行った。測定には基質 (10 mM)、PPb (pH 7.0、50 mM)、Phenol (1.5 mM)、4 アミノアンチピリン (1.5 mM)、ペルオキシダーゼ (2 U/ml) を用いて POD/Phenol/4A. A. 法により 505 nm の吸光度の変化を測定することにより行った。得られた酵素の活性ならびに基質特異性について大腸菌を用いて生産された組換え FAO ならびに酵母 *Pichia* sp. N1-1 野生株で生産された酵素と比較した結果を表 XX に示す。このように、組換え DNA により、より高い活性を有する FAO を生産することができた。

【0071】

実施例 7

フルクトシルアミン類のアッセイ

本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いてフルクトシルバリンをアッセイした。ペルオキシダーゼ～4-アミノアンチピリン系を用いた測定系を用いて、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素 (FAO) に対し、フルクトシルバリン酸化活性のフルクトシルバリン濃度依存性について測定した。1.5 mM 4-アミノアンチピリン、2.0 mM フェノール、2 U/ml ペルオキシダーゼを含む

10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の存在下で、室温で1分間反応させた時の505 nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素反応速度とした。0.1 mMから5 mMの間で直線性が見られ、この濃度範囲内でのフルクトシルバリン定量が可能であった。

【0072】

実施例 8

フルクトシルバリン酸素電極型酵素センサー

実施例 5 に従い調製したFAO100 マイクロリットル (5.7 mg 蛋白質 / ml) をキムワイプに含浸し、これをDKK社製酸素電極に装着し透析膜によって覆った。作成した酵素電極を30℃に保温した10 ml PBS (pH 7.4) 内に挿入した。ここに1 Mのフルクトシルバリン水溶液50 マイクロリットルを随時添加し、その時の電流減少値を観測した。すなわち、本発明の新規フルクトシルアミン 酸化酵素を用いた酵素センサーにより、5 mM-20 mMの範囲でフルクトシルバリンの定量を行うことができた。

【0073】

実施例 9

メディエータ型酵素センサー

実施例 5 に従い調製したFAO0.34 unit分を、凍結乾燥し、カーボンペースト20 mgと混合し、カーボンペースト電極に充填し、濾紙上で表面を平らにした。1%グルタルアルデヒド30分間、表面を架橋した後、10 mM リジンで20分処理することで未反応のアルデヒド基をつぶした。これを酵素電極とし、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で1時間以上室温で攪拌し、平衡化した。メディエーターとして終濃度1 mMのメトキシPMSを含む、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を反応溶液とし、総量を10 mlとした。そこに作用電極として作製したカーボンペースト電極を用い、対極として白金電極、参照極としてAg / AgCl電極を用い+0.15 Vの電位を印加した。測定は25℃で行った。電流値が定常になったところ (約1時間) で、基質 (フルクトシルバリン) 溶液を100 μ l ずつ注入した。基質の注入に伴って得られるピーク電流の、定常電流値からの高さを応答電流値として用いた。フルクト

シルバリンを加えていないときの電流値を 0 A とし応答電流値を計測した。このときのフルクトシルバリン濃度に対する応答電流値は濃度に依存していた。注入したフルクトシルバリン濃度に対し、0.1 mM から 0.6 mM の範囲で応答電流値との間に直線性を示し、この範囲において計測可能であることが示された。サンプルを注入後、定常電流値を示すまでには 4 分ほどであった。

【0074】

実施例 10

過酸化水素検出型センサー

まず酵素固定化膜を調製した。実施例 5 に従い調製した FAO 50 μ l (0.05 unit 分) と光架橋性樹脂プレポリマーである PVA-SbQ 水溶液 0.23 g を混合し、プレート上に 21 cm² の面積に薄く伸ばした。暗所で 5 時間風乾した後、両面を蛍光灯の光に 5 分ずつさらした。この膜を光固定化酵素膜とし 4℃ で保存した。作製した膜を、BAS 社製白金電極 (モデル No. 11-1012) 表面に被覆してからナイロンネットをかぶせ O リングで固定して酵素電極とし、作用極とした。参照電極に Ag/AgCl、対極には白金電極を用いた。恒温セル (25℃) に 500 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を 10 ml 加え、光架橋性樹脂固定化酵素電極をしんせきした。ポテンシオスタットを用いて電位 +0.6 V vs. Ag/AgCl を印加し、電流値が定常になったところ (約 1 時間) で、基質 (フルクトシルバリン) 溶液を 100 μ l ずつ注入した。基質の注入に伴って得られるピーク電流の、定常電流値からの高さを応答電流値として用いた。構築したバッチ型のシステムを用いて、フルクトシルバリン濃度に依存した応答曲線が得られた。注入したフルクトシルバリン濃度に対し、0.05 mM から 2 mM の範囲で直線性を示し、この範囲において計測可能であることが示された。

【0075】

実施例 11

プルシアンプルー型センサー

グラッシーカーボン電極 (BAS 社、モデル No. 11-2012) 上で 0.1 M 塩化カリウム緩衝液中に終濃度 2 mM ヘキサシアノ鉄 (III) カリウムと、

2 mMの塩化 (I I I) 鉄を加え、25℃、60秒間、+0.4 V vs Ag / AgCl の電位を印加し、フィルムを付着させた。その後、-0.05 V から 0.35 V の電位を印加 (10回) していくことでフィルムを形成させていき、プルシアンブルーフィルム固定化電極を作製した。実施例5に示した方法 (0.136 unit) で作製したFAO固定化膜でプルシアンブルーフィルム固定化電極を被覆した。参照電極にAg / AgCl、対極には白金電極を用いた。恒温セル (25℃) に500 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を10 ml 加え、を用いた。ポテンシオスタットを用いてプルシアンブルーフィルム固定化酵素電極に0.05 V vs. Ag / AgCl を印加し、電流値が定常になったところ (約1時間) で、基質 (フルクトシルバリン) 溶液を100 μ l ずつ注入した。基質の注入に伴って得られるピーク電流の、定常電流値からの高さを応答電流値として用いた。構築したバッチ型のシステムを用いて、フルクトシルバリン濃度に依存した再現性の良い結果が得られた。注入したフルクトシルバリン濃度に対し、0.1 mMから1.6 mMの範囲で応答電流値との間に直線性を示し、この範囲において計測可能であることが示された。サンプルを注入後、定常電流値を示すまでには6分ほどであった。

【0076】

【発明の効果】

本発明により *Pichia* sp. 由来の糖化ヘモグロビン (HbA1c) 測定用の酵素、フルクトシルアミン酸化酵素の構造遺伝子をクローニングし、大腸菌において組換え生産することに成功した。このことにより、大量にFAOを生産できるようになった。本酵素は臨床検体の分析に応用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、*Pichia* sp. N1-1株由来フルクトシルアミン酸化酵素のアミノ酸配列ならびに遺伝子配列を示す。アミノ酸配列は配列表・配列番号1に対応し、遺伝子配列は配列表・配列番号2に対応する。

【図2】 図2は、*Pichia* sp. N1-1株由来フルクトシルアミン酸化酵素のアミノ酸配列を示した配列表・配列番号1を示す。

【図3】 図3は、*Pichia* sp. N1-1株由来フルクトシルアミン酸

化酵素の遺伝子配列を示した配列表・配列番号 2 を示す

- 【図 4】 図 4 は本発明に用いられた P C R プライマーを表す。
- 【図 5】 図 5 は発現ベクター p T N 1 を表す。
- 【図 6】 図 6 は組換え F A O の大腸菌での生産を表す。
- 【図 7】 図 7 は組換え F A O の電気泳動写真を表す。
- 【図 8】 図 8 は組換え F A O の活性と基質特異性を表す。

【書類名】 図面

【図 1】

図 1 は、*Pichia* sp. N1-1 株由来フルクトシルアミン酸化酵素のアミノ酸配列ならびに遺伝子配列を示す。アミノ酸配列は配列表・配列番号 1 に対応し、遺伝子配列は配列表・配列番号 2 に対応する。

1	ATGGAATCGA TAATTATAGT TGTGCGGHT ACTTIGGHC TTTCACAGC CTACAGGCTT GCCAGAGATG GATACAGAA CATAAATGT
91	TTTGACAAAT TTCCGGTTCC ATCTGAGITA GCTGCTGGAA AGCAGATAA CAAGATTITT CACTACGATT ATGTTGCTCC CCGGCTAAT
181	CCCAATTCAA AAGAAGCGTT GAGTCTCGAA GCATTACACC TTTCGAAGAC AGATCCCGTG TACAAACCGT ACTATCATCC GGTAGGATT
271	ATCCTGCGTG CAAGTTCGGA TGCTCCATTA CTGATGATA AGGATCTACTA TGAAGAGTTG CAAAGAAACG GACTTCGCAA TTATGTTAT
361	ATTTCACCTC CCGAGGAGTT TCGTGAGTAT TTGCCCATTI TAAAGGCGCC GTTACCCAAC TGAAGAGGAT ATGTTCTCBA CGGAGATAC
451	GGATGTTTC ATGCTCGAGA CTCATTGAAA AGTCATACB AAGATTCBA AGGATTCBA GTTGATTTG TGTTCGAGA CGATCGGAA
541	ATTGCGAAT TACTTAACGA AAATGGAAAG TTGACGGGAA TTAGGCGCAG ATCTGGTGCC ATATTCTCG CACAAAATA TGTTCCTGCG
631	TCTGGTGCAA ATGCACTAAC GTTGTTAAAT TTCCAGAGAC AGCTAGAAGG TAAATGTTTC ACTTTCGCAC ATTTCGAGT GAGGATGAA
721	GGATTAAGC CATTAAAG CTGCGCGTC CTITTCATG CCGAAAAGG GTTCTTTC GAGGCTGAGG AABATACGA AATCAAAT
811	TGCAACGAGT ACCCTGGATT TACCCACACA AATGAATCCG GAGATCTAT CCGACTCTAC CGGATGAGA TTCCACTCGA GTCAGCACT
901	GAAATTAGC AATACTGAA AGAACCATG CCGCTGTTG CTGATAGAC TTTCACCAAG ACAAGAATTI GTTGGTGAC CGACTCTGCC
991	GACATGCAAT TGATCTTGT TACTCAGCA GAATACACCA ACCTTATGT AGCATTGGGT GACTCTGGA ATTGCTCAA GATCATGCA
1081	ATCATGGCA AATATGTAG CAAGGTTCTT ACCAAGGTG ATAAAGGATT GATCCCGGA GATAAGAAAT GCTGGAATG GCTGCTGAG
1171	ACTTGGACA AGCGGGGCA GGTCCGCTCG CCGTCTCAT ACCGTGTTG GATTTGAA GAAATTGAG AATGGGTTT TGTGAAAT
1261	CCACACACAC ACAACTAGA ATAA

【図 2】

図 2 は、*Pichia* sp. N1-1 株由来フルクトシルアミン酸化酵素のアミノ酸配列を示した配列表・配列番号 1。

配列表・番号 1 フルクトシルアミン酸化酵素アミノ酸配列

mesiiivgagtfglstaqlardgynikofdkfpvpseiaagndsnkifhydyvaplakpnskerlsleahlwkt dpvykpyyhpvgfi
laassdaplhdkyyeelqknglrnyristpeefreylpilkgplpnwrgyvl dgdngwlhardslksayeeckrlgvefvfgddgeiv
ellnengkitgirarsgaifsaqkyvlsaganavtllnfqrqlgkcoftlahfkvtdeeakafkspvlfnakgfffeadenneiki
oneypgfthtnesgesiplymeiplesaleirqylketmpqfadrpftktricwctdspmqlllcthp Peytonlivasgdsngsfkimpigk
yyskvvtkgdkgldpedkecwkrpetwdkrgqvrwggryrvadlnei ewvsvenptphkle

【図 3】

Pichia sp. N1-1 株由来フルクトシルアミン酸化酵素の遺伝子配列を示した配列表・配列番号 2。

フルクトシルアミン酸化酵素塩基配列

5' -atggagtcgataattatagttgggtccggtacttttgggctttccacagccttacagcttgccagagatggatacaagaacataaaatgtttgacaagttccggttccatct
gagatagctgctggaaacgacagtaacaagattttcactacgattatgttgctcccctggctaaccaattcaaaagaacgggtgagctcgaagcattacaccttgaagac
agatccggtgtacaaaccgtactatcatccggtaggattatcctggctgcaagttccgatgctccattactgcatgataaggaatactatgaagagttgcaaaaaacggacttc
gcaattatcgttatattcaacccccgaggagtctgtgagtattgcccatttaaaggggccgttaccacaactggagaggatatgttctcgacggagataacggatggtgcatg
ctcgagactcattgaaaagtcatacgaagaatgcaaacgattgggagtggaattgtgttgagacgatggggaaattgtcgaattacttaacgaaaatggaagtgcagg
gaattaggggccagatctggtgccatattctcggcacaaaaatatgttctcagctctggtgcaaatgcagtaacgttgtaaatttccagagacagctagaaggtaaatgtttcacttt
ggcacatticaaagtgcaggatgaagaagctaaagcatttaaagcttgcgggtcctttcaatgccgaaaaagggttttttcgaggctgatgaaaaaacgaaatcaaaatttg
caacgagtaccctggattaccacacaaatgaatccggagagtctatcccactctaccggatggagattccactcgagtcagcacttgaaattagacaatacttgaaagaaac
catgcctcagtttgctgatacctttaccaagacaagaatttgggtgtaccgactctccgacatgcaattgatctgtgtactaccagaatacaccaaccttattgtagcat
cgggtgactctggaaattcgttcaagatcatgccaatcattggcaaatatgicagcaagggtgttaccaaagggtgataaaggattggatccggaagataaagaatgctggaatg
gcgtcctgagacttgggacaagcgggggcagggtccgtgggtggtcgataccgtgttcggattgaacgaaattgaagaatgggtttctgttgaatatccacaccacaca
aactagaataa-3'

【図 4】

本発明に用いられたPCRプライマーを表す。

FAO-F1 5'-GGXACXTGGGGXWSXWSXACXGCXYTXCA-3'

FAO-R2 3'-TCYTCRTYXGGYTCVAWRAARAAXCC-5'

ただし* S=C+G Y=C+T R=A+G X=A+C+G+T W=A+T V=A+C+G

FAO-F3 : 5'-ATTTCAAAGTGACGGATGAAGAAGCTAAAG-3'

adapter primer : 3'-CGCAGTTTTCCAGTCACGAC-5'

FAO-F5 5'-GTGCATACGAAGAATGCAAACGATTGGGAGTGG-3'

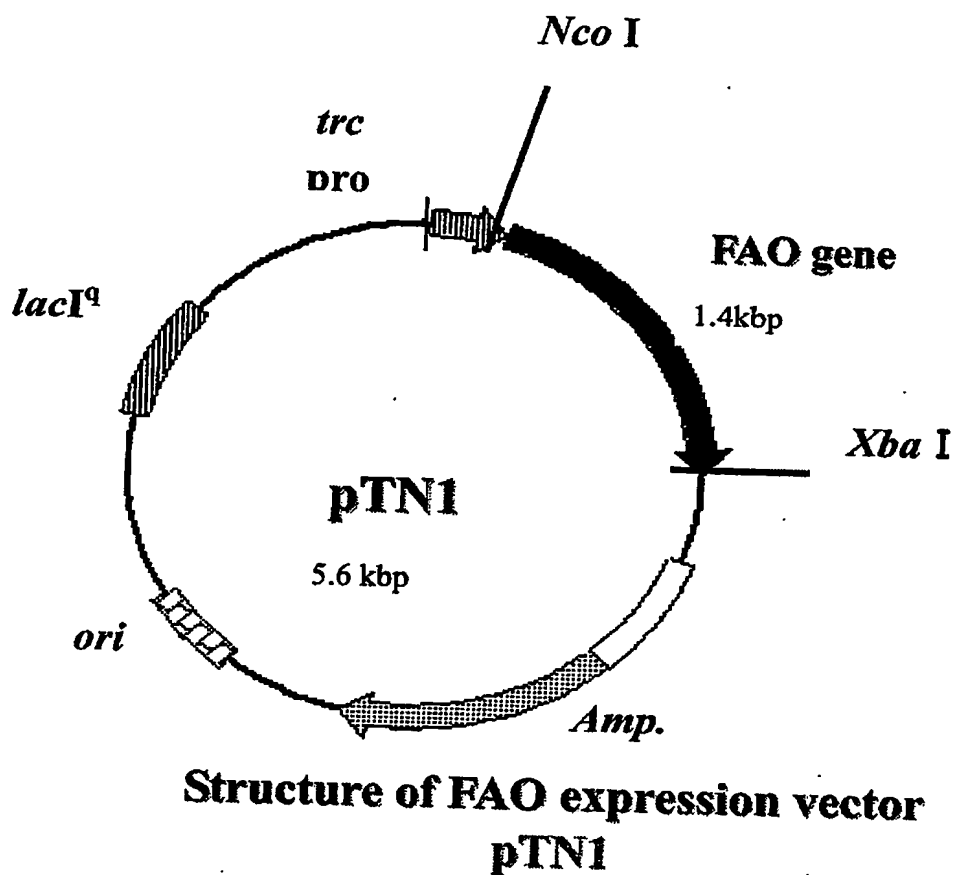
FAO-R6 3'-CCATCCGTTATCTCCGTCGAGAACATATCCTC-5'

FAO-NcoI : 5'-ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-XbaI : 3'-TTGATTCTAGACATGTATGTTGTAATCTTG-5'

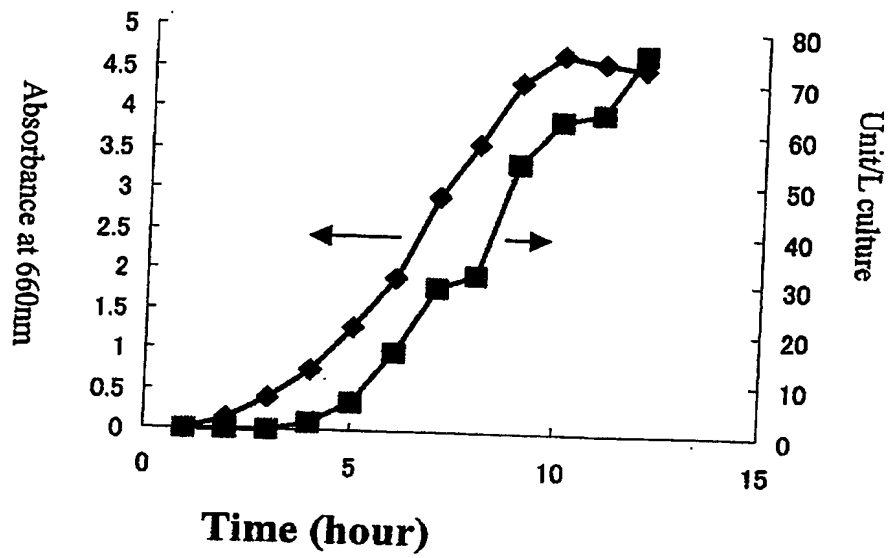
【図5】

発現ベクター pTN1 を表す。



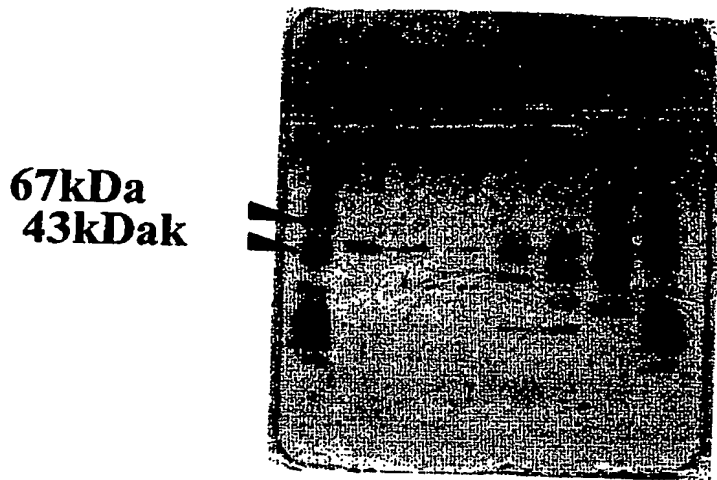
【図 6】

組換え F A O の大腸菌での生産を表す。



【図7】

組換えFAOの電気泳動写真を表す。



1:LMW

2:Soluble

3:after

DEAE 5PW

4:after RESOURCE Phe 5:after

Bioasist Q No.23

6:after Bioasist Q No.24

7:after Bioasist Q No.25

8:LMW

【図 8】

組換え F A O の活性と基質特異性を表す。

Table. Kinetic parameters

	Recombinant	Wild type
<i>K_m</i> (mM)	5.9	5.6
<i>V_{max}</i> (U/mg)	7.1	4

Table. Substrate specificity

Substrate	Activity(%)	
	Recombinant	Wild type
fructosyl valine	100	100
fructosyl lysine	120	135
fructosyl glycine	4	9
fructosyl alanine	56	60
fructosyl leusine	14	31
fructosyl phenylalanine	104	103
glucose	0	0
sarcosine	0	0

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

フルクトシルバリンと反応しうる新規フルクトシルアミン酸化酵素の製造方法、およびこれを用いる分析方法を提供する。

【解決手段】

酵母 *P i c h i a* sp. 由来フルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターにより微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、フルクトシルアミン酸化酵素を製造する。

【効果】 製造されたフルクトシルアミン酸化酵素はフルクトシルバリンに特異的でありこれをもちいたキット・センサーは糖化ヘモグロビン計測に有用である。

【選択図】 なし

特願 2003-116348

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日

1996年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区南1-13-16

氏 名

早出 広司

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**